

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

48893U-B.  
DT-206826..U35.

B4.

SCHD.09-02-72.

\*DT-2206826-Q.

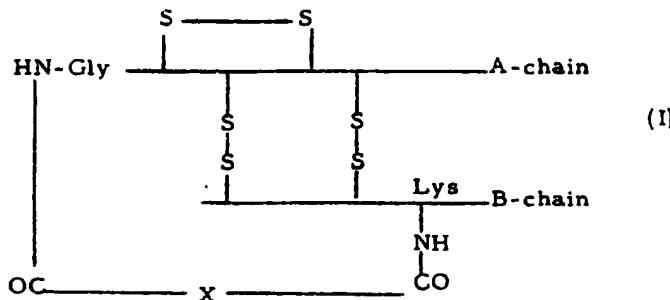
Schering AG.

M.  
C07c-103 Ank-27/00 (16-08-73)...

INTRAMOLECULARLY CROSSLINKED INSULINS -  
WITH REDUCED IMMUNOGENICITY AND PROLONGED  
ACTIVITY..

NEW

Intramolecularly crosslinked insulins of formula (I):



B4-B2D, B12-H5, B12-M10.

3

24

(where X is a 2- to 8-membered alkylene group opt. interrupted by 1 or more O-atoms or NH groups).

ADVANTAGES USE

The new derivs. are less immunogenic and longer-acting than insulin. They can be used in the form of iso- or hypo-tonic solns. of ca. 40 IU/ml. as hypoglycaemic agents for the treatment of diabetes.

PREPARATION

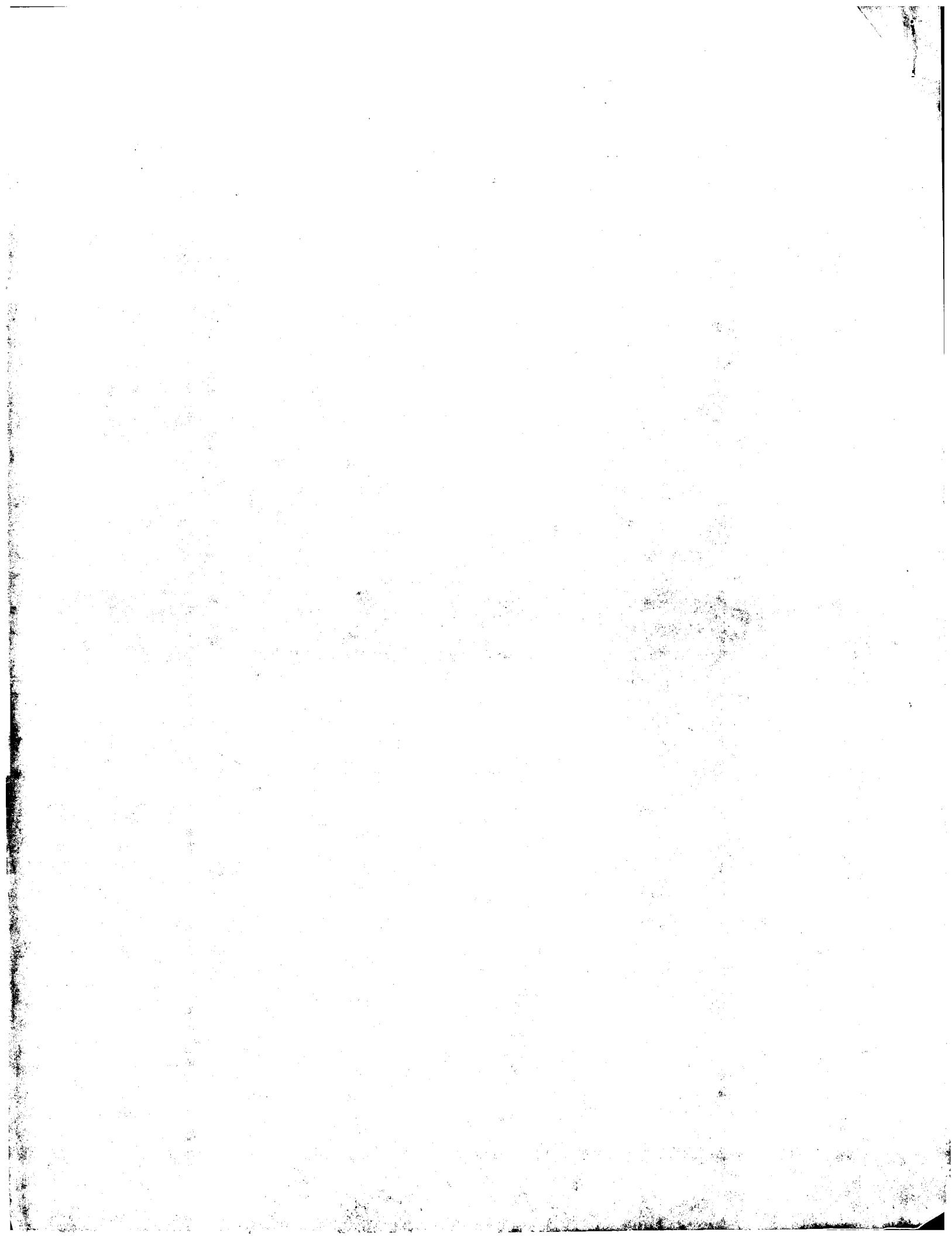
(I) are prep'd. by reacting insulin with appropriate dicarboxylic acid derivs. (e.g. di-N-hydroxysuccinimide esters, di-p-nitrophenyl esters, bis(alkoxycarbonyl anhydrides), dihalides etc.) or with alkanediisocyanates. The reaction is generally carried out in high dilution in a polar solvent, esp. dimethylformamide, dimethyl sulfoxide or hexamethylphosphortriamide, in the presence of a tert. amine such as NEt<sub>3</sub> or N-ethylmorpholine. The product can be purified by usual methods of peptide chemistry, e.g. chromatography on 'Sephadex' (R.T.M.) or ion-exchangers, carrier-free electrophoresis or counter-current distribution.

Contd 48893U

EXAMPLE

Bovine insulin (1.004 g) in dimethylformamide (1000 ml) is treated with NEt<sub>3</sub> (353 µl) and succinic acid bis-succinimide ester (65.6 mg). After standing 15 hrs. at room temp., dimethylformamide is distilled off in vacuo and the residue dialysed against 0.01-M ammonium hydroxide soln. and freeze-dried, then chromatographed on DEAE-'Sephadex' in 7-M urea buffer to give Gly<sup>A1</sup>-ε-Lys<sup>B20</sup>-succinoyl-insulin (523mg).

48893U



(51)

Int. Cl.:

C 07 c, 103/52

A 61 k, 27/00

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DEUTSCHES PATENTAMT



(52)

Deutsche Kl.:

12 q, 6/01

30 h, 2/36

(10)

# Offenlegungsschrift 2 206 826

(11)

Aktenzeichen: P 22 06 826.4

(21)

Anmeldetag: 9. Februar 1972

(22)

Offenlegungstag: 16. August 1973

(43)

Ausstellungspriorität: —

(30)

Unionspriorität

(32)

Datum: —

(33)

Land: —

(31)

Aktenzeichen: —

---

(54)

Bezeichnung: Intramolekular vernetzte Insulinderivate

(61)

Zusatz zu: —

(62)

Ausscheidung aus: —

(71)

Anmelder: Schering AG, 1000 Berlin und 4619 Bergkamen

Vertreter gem § 16 PatG —

---

(72)

Als Erfinder benannt: Lindsay, David G., Dr., Hove, Sussex (Großbritannien)

DT 2 206 826

ORIGINAL INSPECTED

Berlin, den 9. 2. 1972

2206826

Intramolekular vernetzte Insulinderivate

Die Erfindung betrifft intramolekular vernetzte Insulinderivate und Arzneimittel auf Basis dieser Insulinderivate sowie Verfahren zu ihrer Herstellung.

Die neuen Insulinderivate zeichnen sich durch eine reduzierte immunogene Wirkung (Stimulation der Bildung von Antikörpern) und eine im Vergleich zum Insulin länger anhaltende blutzucker-senkende Wirksamkeit aus. Aufgrund ihrer günstigen biologischen Eigenschaften sind die neuen Insulinderivate für die Behandlung des insulinpflichtigen Diabetes besonders gut geeignet.

Insulin ist als Hormon mit Proteincharakter nur parenteral applizierbar und hat darüber hinaus nur eine kurze Halbwertszeit. Zur therapeutischen Verwendung als Antidiabetikum werden daher Depotpräparate verwendet, die entweder durch Zusatz fremder Stoffe, wie zum Beispiel Protamin oder Surfen<sup>(R)</sup>, oder durch Überführung in die Kristallform, in der Insulin als Hexameres vorliegt, erhalten werden.

Beide Formen des protahiert wirksamen Insulins haben den Nachteil, daß immunogene Eigenschaften verstärkt auftreten, indem die fremden Zusätze im Sinne eines Adjuvans-Effektes und die Kristallform durch die Größe des Moleküls die immunogene Wirkung erhöhen.

- 2 -

309833/1109

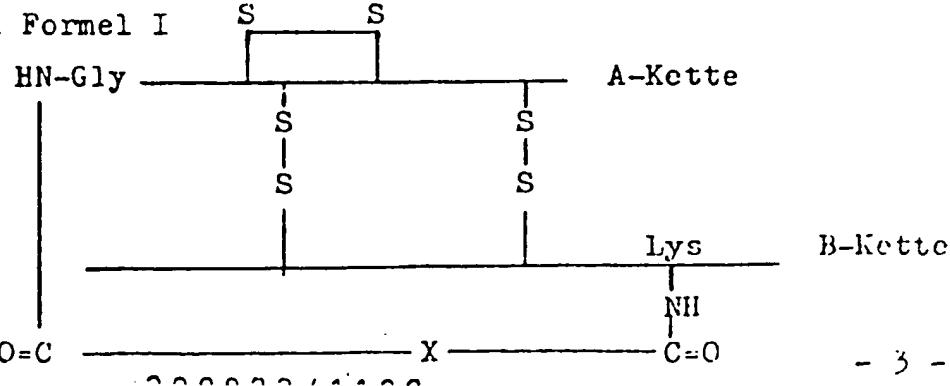
2206826

Man hat auch "Mono-Compound-Insulin" bzw. "Single-Peak-Insulin" vorgeschlagen, die frei von adjuvantartig wirkendem Proinsulin sind. In dieser Form besitzt Insulin zwar eine geringere immuno-gene Wirkung, eine Verlängerung der biologischen Wirkung ist aber auch hier nur durch Depotformen möglich, wobei dann wieder die immunogenen Eigenschaften verstärkt werden.

Aufgabe der Erfindung ist es, Insulinderivate zu entwickeln, die ohne Zusätze eine langanhaltende biologische Wirksamkeit aufweisen.

Es wurde nun gefunden, daß intramolekular vernetzte Insulinderivate, bei denen die Aminogruppe des Glycinrestes in Position 1 der A-Kette und die  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysinrestes in Position 29 der B-Kette durch eine Kette von 4 bis 10 Atomen überbrückt sind, keine oder nur eine sehr geringe Reduktion der biologischen Wirkung zeigen, aber bereits bei intravenöser Applikation eine 2 bis 4 mal längere Wirkungsdauer haben. Die Wirkungsdauer kann durch subcutane Applikation noch verlängert werden. Da diese protahierte Wirkung ohne die üblichen, die immunogenen Eigenschaften verstärkenden, Depotformen erreicht wird, haben die erfindungsgemäßen Verbindungen gegenüber den handelsüblichen Insulinen große Vorteile.

Die Erfindung betrifft somit intramolekular vernetzte Insuline der allgemeinen Formel I



- 3 -

2206826

worin X eine gegebenenfalls durch eine oder mehrere O-Atome oder NH-Gruppen unterbrochene Alkylengruppe aus 2 - 8 Gliedern bedeutet.

Die neuen Insulinderivate lassen sich dadurch herstellen, daß man Insulin mit Dicarbonsäurederivaten oder Alkandiisocyanaten umsetzt.

Als Dicarbonsäurederivate kommen Di-N-Hydroxysuccinimidester, Di-p-Nitrophenylester, Bis-(Alkoxycarbonyl-anhydride), Di-halogenide usw. infrage. Gemäß der Bedeutung von X kann die Alkylenkette in den Dicarbonsäurederivaten und in den Diisocyanaten durch O-Atome oder NH-Gruppen unterbrochen sein.

Die Umsetzung wird in einem polaren Lösungsmittel, insbesondere Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid oder Hexamethylphosphorsäure-triamid, in Gegenwart eines tertiären Amins wie Triäthylamin oder N-Äthylmorpholin in hoher Verdünnung vorgenommen.

Die Reinigung erfolgt nach den in der Peptid- und Proteinchemie üblichen Methoden, wie zum Beispiel durch Chromatographie über Sephadex R oder Ionenaustauscher, durch trägerfreie Elektrophorese oder Gegenstromverteilung.

Die Insulinderivate können durch Endgruppenbestimmung (Dansylmethode, DNP-Methode, Edmannabbau), durch Trypsinabbau und

- 4 -

309833 / 1109

SCHERING AG  
Patentabteilung

- 4 -

2206826

oxydative Sulfitolyse eindeutig charakterisiert werden.

Die neuen Insulinderivate können in Form isotonischer oder hypotonischer Lösungen von etwa 40 IE Wirkstoff/ml als blutzuckersenkende Arzneimittel zur Behandlung des Diabetes angewendet werden.

- 5 -

309833/1109

SCHERING AG

Patentabteilung

- 5 -

2206826

Beispiel 1:

1,004 g (175  $\mu$  Mol) Kinderinsulin in 1000 ml Dimethylformamid werden mit 353  $\mu$ l (2,52 m Mol) Triäthylamin und 65,6 mg (210  $\mu$  Mol) Bernsteinsäure-bis-succinimidester versetzt.

Die Reaktionslösung bleibt 15 Stunden bei Raumtemperatur stehen. Dann wird das Dimethylformamid im Vakuum abdestilliert, der Rückstand gegen 0,01 m Ammoniumhydroxidlösung dialysiert und anschließend gefriergetrocknet.

Das Produkt wird unter Verwendung von DEAE-Sephadex in 7 m Harnstoffpuffer chromatographiert.

Man erhält 523 mg Gly <sup>A<sup>1</sup></sup>- $\epsilon$ -Lys <sup>B<sup>29</sup></sup>-succinoyl-insulin.

Papierelektrophorese:

Bedingungen: 2,4 m Ameisensäure/4 m Harnstoff, Anfärbung mit Pauly-Reagenz. Es wurden 300  $\mu$ g aufgetragen. Die Substanz wandert als einheitliche Bande. Ihre relative Wanderungsgeschwindigkeit liegt bei 0,74 (Insulin: 1,00).

- 6 -

309833/1109

- 6 -

Beispiel 2:

2200826

Eine Lösung von 30,7 mg (210  $\mu$  Mol) Adipinsäure in  
3 ml Dimethylformamid und 56,3  $\mu$ l (420  $\mu$  Mol)  
Triäthylamin wird bei -10°C mit 56,7  $\mu$ l (420  $\mu$  Mol)  
Chlorameisensäureisobutyester versetzt.

Diese Lösung wird bei -10°C zusammengegeben mit einer  
Lösung von 1,004 g Kinderinsulin (175  $\mu$  Mol) in  
1000 ml Dimethylformamid und 353  $\mu$ l (2,52 m Mol)  
Triäthylamin.

Nach einer Reaktionszeit von 20 Stunden bei Raumtemperatur  
wird wie in Beispiel 1 aufgearbeitet und gereinigt.

Man erhält 490 mg Gly  $A^1$ - $\epsilon$ -Lys  $B^{29}$ -adipinoyl-insulin.

Beispiel 3:

44,1 mg Suberoyldichlorid (210  $\mu$  Mol) in 3 ml Dimethyl-  
formamid werden mit 1,004 g Kinderinsulin (175  $\mu$  Mol)  
in 1000 ml Dimethylformamid und 411,5  $\mu$ l Triäthylamin  
(2,94 m Mol) versetzt.

Nach einer Reaktionszeit von 5 Stunden wird wie in Beispiel 1  
aufgearbeitet und gereinigt.

Man erhält 520 mg Gly  $A^1$ - $\epsilon$ -Lys  $B^{29}$ -suberoyl-insulin.

- 7 -

B e i s p i e l 4:

2206826

1,004 g (175  $\mu$  Mol) Rinderinsulin werden in 1000 ml  
Dimethylformamid gelöst und mit 353  $\mu$ l (2,52 m Mol)  
Triäthylamin und 55,3 mg (210  $\mu$  Mol) Hexamethylen-  
diisocyanat versetzt.

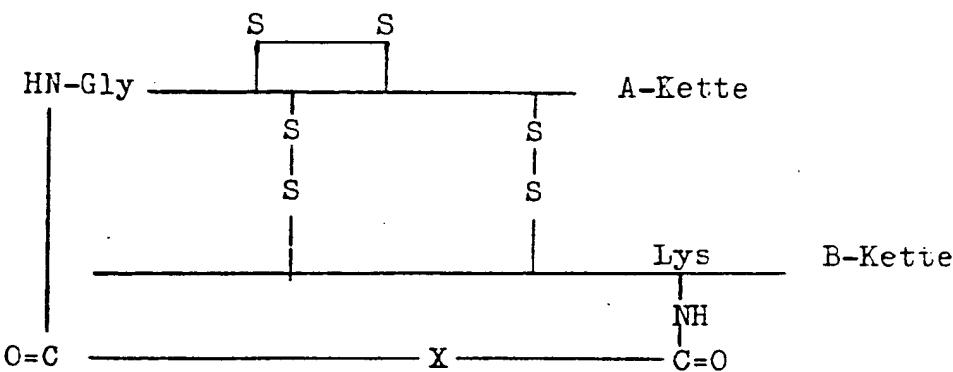
Nach 15 Stunden bei Raumtemperatur wird wie in Beispiel 1  
aufgearbeitet und gereinigt.

Man erhält 564 mg Gly <sup>A1</sup>- $\epsilon$ -Lys <sup>B29</sup>-hexamethylen-di-  
carbamoyl-insulin.

Patentansprüche:

2206826

1.) Intramolekular vernetzte Insuline der allgemeinen Formel I



worin X eine gegebenenfalls durch eine oder mehrere O-Atome oder NH-Gruppen unterbrochene Alkylengruppe aus 2 - 8 Gliedern bedeutet.

2.) Gly <sup>A1</sup>-ε-Lys <sup>B29</sup>-succinoyl-insulin.3.) Gly <sup>A1</sup>-ε-Lys <sup>B29</sup>-adipinoyl-insulin.4.) Gly <sup>A1</sup>-ε-Lys <sup>B29</sup>-suberoyl-insulin.5.) Gly <sup>A1</sup>-ε-Lys <sup>B29</sup>-hexamethylendicarbamoyl-insulin.

2206826

- 6.) Blutzuckersenkendes Arzneimittel mit lang anhaltender Wirkung auf Basis einer Verbindung gemäß Anspruch 1.
- 7.) Verwendung der Insulinderivate gemäß Anspruch 1 in einer pharmazeutischen Präparation.
- 8.) Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel I, dadurch gekennzeichnet, daß man Insulin mit Dicarbonsäurederivaten oder Alkandiisocyanaten umsetzt.

309833/1109

300000/1100